

联合检测 HBV 前 S1 抗原和核心抗原的临床意义^{*}

章述军¹ 田德英¹ 李 晖¹ 周 健¹ 袁 权² 葛胜祥² 张 军² 夏宁邵²

1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科 (湖北 武汉, 430030)

2. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

摘要 目的: 探讨联合检测血清 HBV 前 S1 抗原 (preS1) 和核心抗原 (HBcAg) (均为 HBV 核酸相关抗原, nucleic acids related antigen HBV NRAg) 的意义及临床价值。**方法:** 采用 ELISA 法对 393 份 HBsAg、HBV DNA 双阳性的血清和 612 份 HBsAg 阴性血清进行 HBV NRAg 检测, 所有标本均采用多区段巢式 PCR 确认阳性、阴性, 采用荧光定量 PCR 法进行 HBV DNA 定量分析。**结果:** 393 份 HBsAg、HBV DNA 双阳性血清中, HBV NRAg 阳性为 382 份, 其阳性率为 97.2%; 612 份 HBsAg 阴性的血清标本中, 609 份确认为 HBV DNA 阴性, 其中检出 2 份 HBV NRAg 阳性, 607 份为阴性, 其 HBV NRAg 的阴性率为 99.7% (607/609), 另 3 份 HBsAg 阴性血清 HBV DNA 阳性者, 其 HBV NRAg 均为阳性。**结论:** 联合检测 preS1 和 HBcAg 的 HBV NRAg 可作为临床 HBV 感染的筛选及判断 HBV 复制的有意义的补充项目。

关键词 肝炎病毒, 乙型; 前 S1 抗原; 核心抗原

Clinical significance of combined detecting hepatitis B virus preS1 antigen and core antigen

ZHANG Shu-jun, TIAN De-ying, LI Hui, et al. 1. Department of Infectious Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (Wuhan Hubei, 430030) China

Abstract Objective To study the clinical significance of combined detecting preS1 antigen and hepatitis B core antigen (HBV NRAg nucleic acids related antigen). **Methods** Serum samples were collected from 393 patients positive for HBsAg and HBV DNA, and 612 samples negative for HBsAg. HBV pre-S1 combined with HBcAg were detected by HBV NRAg ELISA. HBV DNA were detected by fluorescent quantitation polymerase chain reaction (FQ-PCR) and confirmed by nPCR. **Results** Of 393 samples positive for HBsAg and HBV DNA, 382 (97.2%) were positive for HBV NRAg. In 612 samples negative for HBsAg, 609 samples were negative for HBV DNA. The specificity of HBV NRAg was 99.7% (607/609). In addition, the other 3 serum samples with negative for HBsAg and positive for HBV DNA their HBV NRAg were positive. **Conclusion** HBV NRAg ELISA can be a useful supplementary for clinical judgment of HBV infection and replication.

Key Word hepatitis B virus, preS1 antigen, hepatitis B core antigen

乙肝病毒脱氧核糖核酸 (HBV DNA) 检测结果是判断 HBV 感染与否的直接证据。荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 技术近年来迅速发展, 大量应用于临床作为 HBV 感染者传染性评估和评判抗病毒治疗效果的重要指标。但是由于在标准曲线定量时, 标准品的制备目前没有统一的标准, 使各个实验室的检测结果缺乏可比性; 另外 HBV 的高变异性常使 PCR

引物不能特异性结合, 导致假阴性; 而且 FQ-PCR 试剂昂贵, 对实验条件要求较高, 无法在基层医疗单位推广应用^[1, 2]。随着乙肝疫苗和抗病毒药物的使用, HBV 也相应发生各种变异, 其中 S 基因 a 表位变异导致的 HBsAg (-) 的 HBV 感染和前 C 区变异导致的 HBcAg (-), HBV DNA (+) 的 HBV 感染给临床诊断、病情判断及治疗方案的确定带来了巨大的困

* 基金项目: 国家 863 计划 (No. 2006AA02Z442); 通讯作者: 田德英, E-mail: dytj@tj.tjmu.edu.cn

难^[3-5]。近来,前 S1 抗原 (preS1) 和核心抗原 (HBcAg) 作为 HBV 感染的新标志物已受到越来越多的重视。我们利用厦门大学研制的联合检测 HBV 前 S1和核心抗原的乙型肝炎病毒核酸相关抗原诊断试剂盒 (HBV NRAg Nucleic acids related antigen) 对 393份 HBsAg和 HBV DNA 同时阳性的血清进行 HBV preS1和 HBcAg联合检测,并初步探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源 所有 HBV 感染血清阳性标本均来自于 2006年 6月 - 2007年 3月我院感染科门诊和住院患者,共 393 份,每份分离血清 1~ 2ml - 70℃保存,半年内检测。HBsAg阴性血清 612份,来自感染科门诊和体检中心。

1.2 试剂与方法

1.2.1 HBV 血清标志物的检测 采用 ELISA 法,试剂购自于上海科华生物技术有限公司。按照说明书操作,HBsAg HBsAb HBeAg的判定以样品 OD 值 > 阴性对照均值的 2.1倍为阳性。HBeAb HBcAb的判定以样品 OD 值 < Cut Off值为阳性。

1.2.2 HBV DNA 定量检测 用荧光定量 PCR,试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,严格按说明书操作,检测下限为 1×10^3 Copies/ml 以多区段巢式 PCR 作为 HBV DNA 金标准,方法:以蛋白酶 K 法提取,采取适当引物进行巢式 PCR。S区外侧引物 aF1: 5-GTC TGC GGC GTT TTA TC-3和 aR1: 5-ACA GTG GGG GAA AGC-3 内侧引物 aF2: 5-TGC CCG TTT GTC CTC TA-3和 aR2: 5-AGA AAC GGR CTG AGG C-3 (产物约 200bp)。前 C区外侧引物 pcF1: 5-CAC CTC TGC CTA ATC ATC TC-3和 pcR1: 5-ATG CTC AGG AGA CTC TAA GG-3 内侧引物为 pcF2: 5-ACT GTT CAA GCC TCC AAG CT-3和 pcR2: 5-AAG GAA AGA AGT CAG AGG C-3 (产物约 120bp)。

1.2.3 HBV PreS1和 HBcAg的联合检测 用双抗体夹心 ELISA 法,酶标板预包被抗-PreS1和 HBcAg 单抗,结果以 HBV NRAg表示,阳性表示血清中 PreS1 和 或 HBcAg 阳性。试剂盒由厦门大学传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心研制,北京方泰生物药业有限公司生产,厦门大学夏宁邵教授惠赠。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0进行卡方检验。

2 结果

2.1 393份 HBsAg, HBV DNA 双阳性血清检测结果 354 份经 FQ-PCR 检测 HBV DNA $> 10^3$ Copies/ml 其余 39 份血清 HBV DNA $< 10^3$ Copies/ml 又经多区

段巢式 PCR法检测证实 HBV DNA 为阳性,在此 393 份 HBV DNA 阳性血清中,382份标本 HBV NRAg 阳性,灵敏度达到 97.2% (95% 置信区间为 95.1% ~ 98.4%)。

2.2 612份 HBsAg阴性标本的检测结果 经多区段巢式 PCR 检测证实其中 3份为 HBV DNA 阳性,其 HBV RNAg也同时为阳性;3份血清中有 2份的 HBV 标志物模式为 HBsAb (+)、HBeAg (+)、HBcAb (+),1份仅 HBeAg (+)。对这 3份标本进行双向测序和氨基酸序列比对,结果显示 1份血清模式为 HBsAb (+)、HBeAg (+)、HBcAb (+) 的标本其 HBsAg的第 126 位氨基酸由苏氨酸突变为丙氨酸 (T126A)、第 133 位氨基酸由蛋氨酸突变为苏氨酸 (M133T)、第 134 位氨基酸由苯丙氨酸突变为赖氨酸 (F134K),后证实为 “a” 表位突变株。另 609 份 HBsAg和 HBV DNA 均阴性标本中,检出 2份 HBV NRAg 阳性,特异度达到了 99.7% (95% 置信区间为 98.7% ~ 99.9%)。

2.3 HBV NRAg 与 HBV DNA 的一致性 在我们检测的 1005份血清标本中,HBV NRAg 与 HBV DNA 的总符合率达到了 98.7%, Youden 指数为 0.969, Kappa 值为 0.973 详见表 1。

表 1 HBV NRAg 与 HBV DNA 的检测结果比较 (n)

检测例数	HBV DNA		HBV NRAg	
	阳性	阴性	阳性	阴性
393	393	0	382	11
612	3	609	5	607
合计 1005	396	609	387	618

2.4 393份 HBsAg, HBV DNA 双阳性而 HBV 标志物不同表现模式的血清 HBV NRAg 检出率 见表 2。

表 2 不同 HBV 标志物模式血清 HBV NRAg 的阳性结果 [n (%)]

不同 HBV 标志物模式及例数	HBV NRAg 阳性
HBsAg (+)、HBeAg (+)、HBcAb (+) 152	149 (98.0 149/152)
HBsAg (+)、HBeAb (+)、HBcAb (+) 142	138 (97.0 138/142)
HBsAg (+)、HBeAb (+) 97	93 (95.9 93/97)
HBsAg (+)、HBeAb (+) 1	1 (100.0 1/1)
HBsAg (+) 1	1 (100.0 1/1)

各组间比较, HBV NRAg 阳性率之差异均无显著性意义 (P > 0.05)

2.5 HBV DNA 载量与 HBV NRAg 的关系 在 393 份 HBsAg 和 HBV DNA 双阳性的标本中, HBeAg 在 HBV DNA 阳性血清中的总阳性率为 38.9% (153/393), 与 HBV NRAg 阳性率 99.7% (382/393) 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。此 393 份标本按 HBV DNA 载量分为 3 组。HBV DNA $\geq 10^6$ Copies/ml 组中 HBV NRAg 的阳性率为 99.0% (198/200), HBeAg 的阳性率为 58.0% (116/200), 在 10^6 Copies/ml $>$ HBV DNA $\geq 10^3$ Copies/ml 组中, HBV NRAg 的阳性率为 94% (145/154), HBeAg 的阳性率为 22.1% (34/154); 在 $0 <$ HBV DNA $\leq 10^3$ Copies/ml 组中, HBV NRAg 的阳性率为 100% (39/39), HBeAg 的阳性率为 7.7% (3/39)。各 HBV DNA 载量组中 HBV NRAg 的阳性率比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 而各 HBV DNA 载量组中 HBeAg 的阳性率均低于 HBV NRAg 的阳性率, 两者差异有显著性意义 ($P < 0.01$); 随着病毒载量的降低, HBeAg 阳性率逐渐下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

HBV 为嗜肝 DNA 病毒, 存在于肝细胞内及血液中, 在血清中以 3 种不同颗粒存在, 即球状完整颗粒 (Dane 颗粒)、球状空壳颗粒及棒状颗粒。前 S1 抗原主要存在于球状完整颗粒中, 因此与 HBV DNA 具有很好的相关性^[6]。

目前所用试剂盒均以 HBsAg 抗体和 preS1 抗体配对使用, 因此仅当 preS1 和 HBsAg 都与相应抗体反应时才能检出, 不能避免因为 HBsAg 突变而导致的 preS1 假阴性。

HBcAg 是 Dane 颗粒的重要结构蛋白, 在细胞外仅存在于 Dane 颗粒, 其血清中含量浓度与 HBV DNA 含量高度相关。但由于绝大多数 HBcAg 包裹于病毒外膜内, 导致无法检出, 仅个别感染者的 HBcAg 可暴露在病毒颗粒的表面, 因此检测血清中的 HBcAg 需加用“开壳剂”^[7]。

厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心利用两株 preS1 单抗和两株 HBcAg 单抗和高效孔内病毒裂解液, 建立了联合检测 preS1 和 HBcAg 的双抗体夹心法 ELISA, 即 HBV NRAg ELISA 试剂盒, 有助于解决检测中出现假阴性的问题。

在 HBsAg、HBV DNA 双阳性的 393 份血清中, HBV NRAg 的灵敏度达到了 97.2%, 特别是 HBV DNA $> 10^6$ Copies/ml 时, 灵敏度更达到了 99.0%, 特

异度则达到了 99.7%, 且与 HBV DNA 有很好的一致性。本研究结果显示, HBV NRAg 的阳性率与 HBV DNA 载量并无线性关系而仅与血清 HBV DNA 的是否存在相关。HBV DNA 阳性的血清中 HBeAg 的阳性率仅为 38.9%, 显著低于 HBV NRAg 可能是由于前 C 区变异引起的, 但随着病毒载量的下降, HBeAg 的特异度逐渐升高。

此外, 检测到 3 份 HBsAg (-), HBV NRAg (+) 阳性的血清, 后经多区段巢式 PCR 证实 HBV DNA (+), 1 份证实为“a”表位变异。在临床上, HBsAg 阴性的 HBV 感染已越来越引起人们的注意, 原因可能是 HBV DNA 低水平感染导致抗原量过低, S 基因变异等引起。特别是我国对献血员和临床体检 HBV 感染的筛查仅仅检测 HBsAg, 可能导致 HBsAg 阴性的 HBV 感染被漏检而造成 HBV 的传播^[8]。本研究结果提示, HBV NRAg 检测可作为 HBV 感染标志物的一个新的补充, 甚至代替 HBsAg 与 HBV DNA 的检测, 对献血员筛选和 HBV 复制监测均有较好的临床价值。

参考文献

- Hodinka RL. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clin Diagn Virol Infect Clin and Diagnostic Virology* 1998; 10: 25-47
- Hatzakis A, Magiorkinis E, Haidich C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 2006; 44: S71-76
- Ingman M, Lindqvist B, Kild-Ljunggren K. Novel mutation in hepatitis B virus preventing HBeAg production and resembling primate strains. *J Gen Virol* 2006; 87: 307-310
- Kazin SN, Chauhan R, Das BC, et al. Association of core promoter mutations with viral breakthrough in chronic hepatitis B patients on long-term lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1525-1532
- Gerlich WH. Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation. *J Clin Virol* 2006; 36 Suppl 1: S18-22
- 李琴, 孙桂珍, 魏玉香, 等. 前 S1 蛋白与病毒 DNA 和核心抗原对乙型肝炎病毒复制诊断的对比. *中华肝脏病杂志*, 2004; 12: 134-136
- Kinoshita T, Rokuhara A, Matsumoto A, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1901-1906
- Raimondo G, Policino T, Cacciola J, et al. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007; 46: 160-170

(收稿日期: 2007-11-14 编辑: 韦怡)